

Isolasi dan Pengklonan Gen Penyandi H⁺-ATPase Membran Plasma dari *Melastoma malabathricum* L.*Isolation and Cloning of the Gene Encoding for Plasma Membrane H⁺-ATPase from Melastoma malabathricum L.*Muzuni¹, Didy Sopandie², Utut Widyastuti Suharsono³, dan Suharsono^{3*}¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Haluoleo (University of Haluoleo), Kampus Bumi Tridharma Anduonohu, Kendari 16232, Indonesia²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia.³Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima 19 November 2012/Disetujui 3 Mei 2013

ABSTRACT

Melastoma malabathricum L. is an Al-accumulating plant that grows well in acidic soils with high level of soluble aluminum in the tropics. One of the important proteins in the detoxifying Al stress is a plasma membrane H⁺-ATPase, a most abundant protein on the plasma membrane, encoded by PMA gene. The objective of this research was to isolate and characterize the gene encoding plasma membrane H⁺-ATPase from M. malabathricum L. Full length cDNA of MmPMA had been successfully isolated through a gradual isolation of the gene. The 5' end and middle part of the MmPMA gene had been successfully isolated by PCR by using total cDNA as template and pma primers designed from some plants, while the 3' end of Mmpma had been isolated by 3' RACE. The parts of the gene had been successfully joined by PCR. The joining product was successfully inserted into pGEM-T Easy and the recombinant plasmid was successfully introduced into *E. coli* DH5a. Nucleotide sequence analysis showed that the length of MmPMA coding sequence was 2,871 bp encoding 956 amino acids with molecular weight of 105.29 kDa and a predicted pI value of 6.84. Local alignment analysis based on nucleotide of mRNA showed that MmPMA is 82% identical to pma Vitis vinifera; 81% to pma Juglans regia, pma Populus trichocarpa, pma Sesbania rostrata, and pma Prunus persica and 80% to pma Lycopersicon esculentum. Based on deduced amino acid sequence, MmPMA is 94% identical to PMA Vitis vinifera and PMA Juglans regia; 93% to PMA Populus trichocarpa; 92% to PMA Vicia faba, Lycopersicon esculentum, and Arabidopsis thaliana, AHA4. MmPMA has 10 transmembrane domains, 4 cytoplasm loops, 6 functional domains and 3 autoregulatory domains.

Keywords: aluminum, cDNA, MmPMA, PCR, RACE**ABSTRAK**

Melastoma malabathricum L. adalah suatu tanaman hiperakumulator Al yang tumbuh pada tanah masam dengan tingkat kelarutan aluminium tinggi pada daerah tropis. Salah satu enzim penting dalam detoksifikasi Al adalah H⁺-ATPase membran plasma, suatu protein yang paling melimpah pada membran plasma, yang disandikan oleh gen PMA. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan mengklon gen yang menyandikan H⁺-ATPase membran plasma dari *Melastoma malabathricum* L. cDNA total telah berhasil disintesis dengan menggunakan transkripsi balik dengan RNA total sebagai cetakan. cDNA MmPMA utuh telah berhasil diisolasi melalui isolasi gen secara bertahap. Bagian ujung 5' dan tengah gen MmPMA telah diisolasi dengan PCR menggunakan cDNA total sebagai cetakan dan primer pma yang didesain dari beberapa tanaman, sedangkan bagian ujung 3' gen MmPMA telah diisolasi dengan 3' RACE. Bagian-bagian gen tersebut telah berhasil digabung menggunakan PCR dan telah disisipkan ke dalam pGEM-T Easy. Plasmid rekombinan tersebut telah berhasil diintroduksi ke dalam *E. coli* DH5a. Analisis sekuen nukleotida menunjukkan bahwa panjang sekuen penyandi MmPMA adalah 2,871 pb yang menyandikan 956 asam amino dengan bobot molekul 105.29 kDa dan prediksi nilai pI sekitar 6.84. Analisis kesejajaran lokal berdasarkan nukleotida mRNA menunjukkan bahwa MmPMA mempunyai kemiripan 82% dengan pma Vitis vinifera; 81% dengan pma Juglans regia, pma Populus trichocarpa, pma Sesbania rostrata, dan pma Prunus persica dan 80% dengan pma Lycopersicon esculentum. Berdasarkan deduksi urutan asam amino, MmPMA mempunyai kemiripan 94% dengan PMA Vitis vinifera dan PMA Juglans regia; 93% dengan PMA Populus trichocarpa; 92% dengan PMA Vicia faba, Lycopersicon esculentum, dan Arabidopsis thaliana, AHA4. MmPMA mempunyai 10 domain transmembran, 4 loop sitoplasma, 6 domain fungsional dan 3 domain autoregulator.

Kata kunci: aluminium, cDNA, MmPMA, PCR, RACE* Penulis untuk korespondensi. e-mail: sony.suharsono@yahoo.com

PENDAHULUAN

Konsentrasi aluminium yang tinggi dalam tanah merupakan salah satu faktor utama yang membatasi pertumbuhan tanaman di tanah masam. Ion Al dapat dengan mudah membentuk kompleks dengan senyawa-senyawa intraseluler pada pH sitosolik sehingga dapat menghambat metabolisme sel (Wang *et al.*, 2006). Peningkatan produksi pertanian terutama di lahan bertanah masam dengan kelarutan aluminium tinggi dapat dicapai dengan melakukan program intensifikasi maupun ekstensifikasi. Kedua program ini membutuhkan kultivar unggul. Kultivar unggul dapat dirakit melalui perbaikan genetik baik melalui persilangan konvensional yang diikuti dengan seleksi sesuai dengan sifat keunggulan yang diinginkan maupun melalui teknologi DNA rekombinan. Pendekatan pemuliaan konvensional dihadapkan pada terbatasnya sumberdaya genetik untuk toleransi tanaman terhadap tanah masam dan Al tinggi. Dengan demikian, perlu dilakukan pendekatan teknologi DNA rekombinan untuk merakit tanaman transgenik yang toleran terhadap tanah masam dan Al tinggi.

Tanaman yang dapat digunakan sebagai sumber gen untuk toleransi tanaman terhadap tanah masam dan Al tinggi antara lain *Melastoma malabathricum* L. yang dapat ditemui terutama di daerah tropis. Tumbuhan tersebut dapat tumbuh dengan baik pada tanah masam sehingga menjadi indikator tanah masam, dan dapat mengakumulasi aluminium dalam jumlah tinggi di daun dan akar sehingga disebut sebagai akumulator Al (Watanabe dan Osaki, 2002). Akumulasi Al di daun *M. malabathricum* L. dapat mencapai lebih dari 10,000 mg Al (kg daun tua)⁻¹ (Watanabe *et al.*, 2003), 8,810 mg Al (kg daun tua)⁻¹ (Mutiasari, 2008), dan lebih dari 7,000 mg Al (kg daun muda)⁻¹ (Watanabe *et al.*, 2003).

Eksresi gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma meningkat pada tanaman yang mengalami cekaman Al dan pH rendah (Anwar *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2004). Eksresi gen yang meningkat menunjukkan adanya peranan gen tersebut dalam meregulasi ketahanan tanaman dari cekaman Al dan pH rendah. Gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma selain terlibat dalam regulasi respon terhadap cekaman Al, juga terlibat dalam berbagai rangsangan lingkungan lain, seperti cekaman NaCl (Janicka-Russak dan Kłobus, 2007; Shen *et al.*, 2011), defisiensi fosfat (Ligaba *et al.*, 2004), dan cekaman ammonium (Zhu *et al.*, 2011). Selain itu, H⁺-ATPase membran plasma juga terlibat dalam pemanjangan sel yang difasilitasi oleh auksin selama perkembangan embrio gandum (Rober-Kleber *et al.*, 2003), dan terlibat pula dalam homeostasis pH sitoplasma tanaman (Young *et al.*, 1998).

Beberapa kajian adaptasi *Melastoma* pada tanah masam dengan kelarutan Al yang tinggi telah dilakukan oleh Watanabe *et al.* (2005) dan Watanabe dan Osaki (2002). Beberapa gen yang diduga terlibat dalam toleransi tanaman terhadap cekaman asam dan Al tinggi telah diisolasi, antara lain gen penyandi *multidrug resistance associated protein* (MRP) (Suharsono *et al.*, 2008), gen penyandi metallothionein type 2 (Mt2) (Suharsono *et al.*, 2009) dan fragmen gen penyandi H⁺-ATPase membran

plasma (Muzuni *et al.*, 2010). Namun, sampai saat ini belum ada gen utuh penyandi H⁺-ATPase membran plasma dari *M. malabathricum* yang telah diisolasi. Berdasarkan fragmen cDNA penyandi H⁺-ATPase membran plasma yang telah diisolasi sebelumnya (Muzuni *et al.*, 2010), maka pada percobaan ini dilakukan isolasi gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma dari *M. malabathricum* menggunakan metode RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) dan RACE (*Rapid Amplification cDNA Ends*).

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Februari hingga April 2009 di Laboratorium Plant Molecular Genetics, Nara Institute of Science and Technology (NAIST), Jepang dan bulan Mei 2009 hingga Februari 2010 di Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Tanaman, Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.

Bahan tanaman yang digunakan adalah daun tumbuhan *M. malabathricum* L. yang tumbuh di lahan masam Jasinga Bogor Jawa Barat. pGEM-T Easy cloning system (3,015 pb) (Promega) digunakan sebagai vektor pengklonan dan *E. coli* DH5 α digunakan sebagai inang vektor rekombinan. Primer aktin ActF (5'-ATGGCAGATGCCGAGGATAT-3') dan ActR (5'-CAGTTGTGCGACCACTTGCA-3') digunakan sebagai alat evaluasi kemurnian cDNA total. Primer degenerated PMA2-F (5'-ATGGGGGAGAAGCCTGARGTRYTRG-3'), dan primer spesifik Mapman2-R (5'-CATCAGGACAACAGTATCCG-3'), dan MaPMAp-R (5'-ACCTCGATGAGATTTTTGTCAACAG-3') digunakan untuk mengisolasi ujung 5' gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma, *MmPMA* (*Melastoma malabathricum* L. plasma membrane H⁺-ATPase). Primer degenerated AF2 (5'-GATGTCTTTTGCAGTGAYAARAC-3') dan AR2 (5'-TCATTGACACCATCWCWGTGTCAT3') digunakan untuk mengisolasi bagian tengah gen *Mmpma* (Muzuni *et al.*, 2010). GeneRacerTM Kit (Invitrogen), primer spesifik Mapman2-F (5'-AAGGCAGATGGCTTTGCTGG-3'), MaPMAp-F (5'-GCATA-AGTATGAGATTGTGAAGCGA-3'), GeneRacerTM 3' primer (5'-GCTGTCAACGATAC-GCTACGTAACG-3'), dan GeneRacerTM 3' Nested primer (5'-CGCTACGTAACGGCATG-ACAGTG-3') digunakan untuk mengisolasi ujung 3' gen. Primer 3'UTR-R (5'-AATCAAA-ATCGACAGTTGCATAAGA-3') digunakan untuk mengamplifikasi bagian 3'UTR.

Metode Penelitian

Penelitian diawali dengan melakukan isolasi RNA mengikuti metode LiCl yang telah dilakukan oleh Muzuni *et al.* (2010) dan diikuti dengan sintesis cDNA total menggunakan SuperScript II RT (Invitrogen). Isolasi gen dilakukan secara bertahap, yaitu isolasi bagian tengah gen, bagian ujung 5', bagian ujung 3', dan gabungan ketiga bagian tersebut.

Isolasi Bagian Tengah Gen *MmPMA*

Bagian tengah gen *MmPMA*, yang selanjutnya disebut sebagai *Mmpmam* (No. akses GenBank: HQ832791), diisolasi berdasarkan metode Muzuni *et al.* (2010).

Isolasi Bagian Ujung 5' Gen *MmPMA*

Ujung 5' gen *MmPMA*, yang selanjutnya disebut sebagai *Mmpma5'*, diisolasi menggunakan 2 tahap. Tahap pertama, sebanyak 1 µL cDNA total dicampur dengan 0.5 µM primer PMA2-F, 0.5 µM primer Mapman2-R, 1x buffer taq, 0.2 mM dNTP mix, 1.25 U LA taq DNA polymerase (Takara) dan H₂O hingga volume akhir 20 µL. PCR dilakukan sebanyak 35 siklus dengan kondisi pra-PCR 94 °C, 5 menit; denaturasi 94 °C, 30 detik; penempelan primer 55 °C, 30 detik; pemanjangan 72 °C, 1.5 menit, dan pasca-PCR 72 °C, 5 menit. Tahap kedua, sebanyak 1 µL produk PCR di atas dicampur dengan 0.5 µM primer PMA2-F, 0.5 µM primer MaPMAp-R, dan komponen lain seperti pada tahap pertama. Kondisi PCR dilakukan seperti pada tahap pertama.

Isolasi Bagian Ujung 3' Gen *MmPMA*

Ujung 3' gen *MmPMA*, yang selanjutnya disebut sebagai *Mmpma3'*, diisolasi menggunakan metode RACE. Sintesis cDNA mengikuti petunjuk dari manual GeneRacer Kit (Invitrogen). PCR dilakukan dengan mencampur 1 µL cDNA total dengan 0.5 µM primer Mapman2-F, 0.5 µM GeneRacer 3' primer, dan komponen lain seperti pada isolasi ujung 5' gen. Sebanyak 1 µL produk PCR dicampur dengan 0.5 µM primer MaPMAp-F, 0.5 µM GeneRacer 3' Nested primer dan komponen lain seperti pada isolasi ujung 5' gen. Kondisi PCR dilakukan seperti pada isolasi ujung 5' gen.

Ligasi Bagian-Bagian Gen *Mmpma* dengan Vektor Pengklonan

Produk PCR dari ketiga bagian gen *Mmpma* masing-masing diligasikan dengan pGEM-T Easy (Promega) mengikuti petunjuk dari Promega Inc. Hasil ligasi masing-masing diintroduksi ke dalam *E. coli* DH5 α mengikuti prosedur Suharsono *et al.* (2009).

Penggabungan Bagian-bagian Gen *MmPMA*

Penggabungan *Mmpmam* dan *Mmpma3'*, yang selanjutnya disebut sebagai *Mmpmam3'*, dilakukan dengan PCR, yaitu mencampurkan 1 µL cDNA total dengan 0.5 µM primer AF2, 0.5 µM primer 3'UTR-R, dan komponen lain seperti pada isolasi *Mmpma5'*. Kondisi PCR juga seperti pada isolasi *Mmpma5'*. Produk PCR selanjutnya diklon ke dalam pGEM-T Easy dan diseku untuk konfirmasi.

Gen utuh (*full length gene*) diperoleh dengan 3 tahap, yaitu (1) amplifikasi *Mmpma5'* dengan primer PMA2-F dan MaPMAp-R (produk PCR 1), dan *Mmpmam3'* dengan primer AF2 dan 3'UTR-R (produk PCR 2); (2) produk PCR 1 dan 2 digabung dengan perbandingan mol yang sama, lalu dicampur dengan 0.2 mM dNTP mix, 1x buffer Taq, 1.25 U LA Taq DNA polymerase, dan ddH₂O hingga volume 20 µL. PCR dilakukan sebanyak 10 siklus dengan kondisi pra-PCR 96 °C, 2 menit; denaturasi 96 °C, 1 menit; penempelan dan pemanjangan 68 °C, 3 menit, dan pasca-PCR 68 °C, 5 menit; (3) sebanyak 1 µL produk PCR tahap 2 dicampur dengan 0.5 µM primer PMA2-F, 0.5 µM primer 3'UTR-R, 0.2 mM dNTP mix, 1x buffer Taq, 1.25 U LA Taq DNA polymerase, dan ddH₂O hingga volume 20 µL. PCR dilakukan sebanyak 30 siklus dengan kondisi PCR seperti percobaan sebelumnya. Selanjutnya gen *MmPMA* diklon ke dalam pGEM-T Easy.

Seleksi *E. coli* DH5 α yang Mengandung Vektor Rekombinan

E. coli DH5 α yang mengandung vektor rekombinan diseleksi menggunakan teknik seperti yang telah dilakukan oleh Muzuni *et al.* (2010).

Analisis cDNA Sisipan

Plasmid rekombinan diisolasi dengan menggunakan prosedur Suharsono *et al.* (2008). Untuk mengeluarkan sisipan, plasmid rekombinan dipotong dengan enzim EcoRI menggunakan prosedur dari Promega Inc. Pengurutan DNA dilakukan dengan menggunakan mesin pengurut DNA otomatis (Automated DNA Sequencer ABI Prism 310, Perkin-Elmer). Analisis kesejajaran lokal (*local alignment*) *MmPMA* berdasarkan nukleotida dan asam amino dengan data yang ada di GenBank dilakukan dengan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) yang disediakan NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Analisis restriksi dilakukan dengan menggunakan program NEBCutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) dan program BioEdit versi 7.0.9.0. Domain potensial dianalisis dengan program motif scan <http://au.expasy.org/prosite/>. Analisis hidrofobisitas menggunakan program BioEdit versi 7.0.9.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi RNA Total

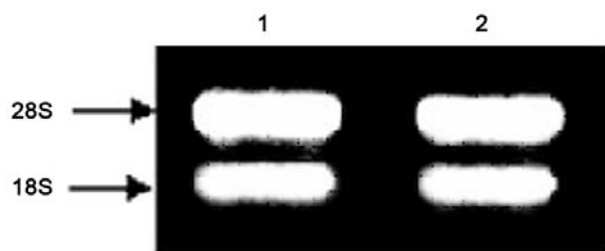
RNA total telah berhasil diisolasi dari daun *Melastoma malabathricum* L. Jumlah RNA total yang diperoleh adalah 234.64 µg tiap gram daun segar. Pengujian kemurnian RNA total yang dilakukan dengan membandingkan nilai OD₂₆₀

dan OD₂₈₀ menunjukkan bahwa RNA total yang diisolasi mempunyai kemurnian yang cukup tinggi karena mempunyai rasio 1.83. RNA yang mempunyai rasio absorbansi pada 260 dan 280 nm antara 1.8 dan 2.0 adalah murni, bebas dari kontaminan protein.

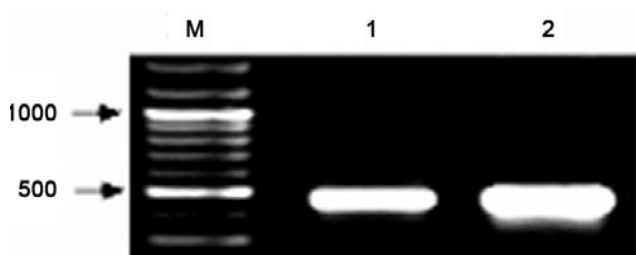
Integritas RNA total dianalisis dengan melakukan elektroforesis di gel agarosa yang terdenaturasi oleh formaldehida. Hasil elektroforesis RNA total menunjukkan adanya 2 pita dominan yang keduanya adalah RNA ribosomal (rRNA) 28S dan 18S (Gambar 1). Adanya dua pita rRNA yang jelas menunjukkan bahwa kedua rRNA tersebut mempunyai integritas yang tinggi sehingga mRNA yang terdapat di suspensi yang sama juga mempunyai integritas yang tinggi.

Sintesis cDNA Total

cDNA total disintesis melalui transkripsi balik dengan menggunakan cetakan (*template*) RNA total dan primer oligo-dT sehingga cDNA yang terbentuk hanya berasal dari mRNA karena hanya mRNA yang mengandung poly(A) pada ujung 3', sedangkan rRNA dan tRNA tidak. Keberhasilan sintesis cDNA total diketahui dengan PCR menggunakan primer spesifik terhadap cDNA ekson1 – ekson2 dari aktin (ActF dan ActR) dan menghasilkan satu pita berukuran 451 pb. Bila terdapat tambahan pita berukuran lebih besar dari 451 pb, berarti cDNA hasil sintesis terkontaminasi DNA karena antara ekson 1 dan ekson 2 mempunyai intron (Muzuni *et al.*, 2010). Sintesis cDNA total telah berhasil dilakukan, hal ini ditunjukkan oleh hasil amplifikasi cDNA dengan primer ActF dan ActR mempunyai produk PCR berukuran 451 pb (Gambar 2).



Gambar 1. RNA Total dari daun *Melastoma malabathricum*. (1,2) RNA Total



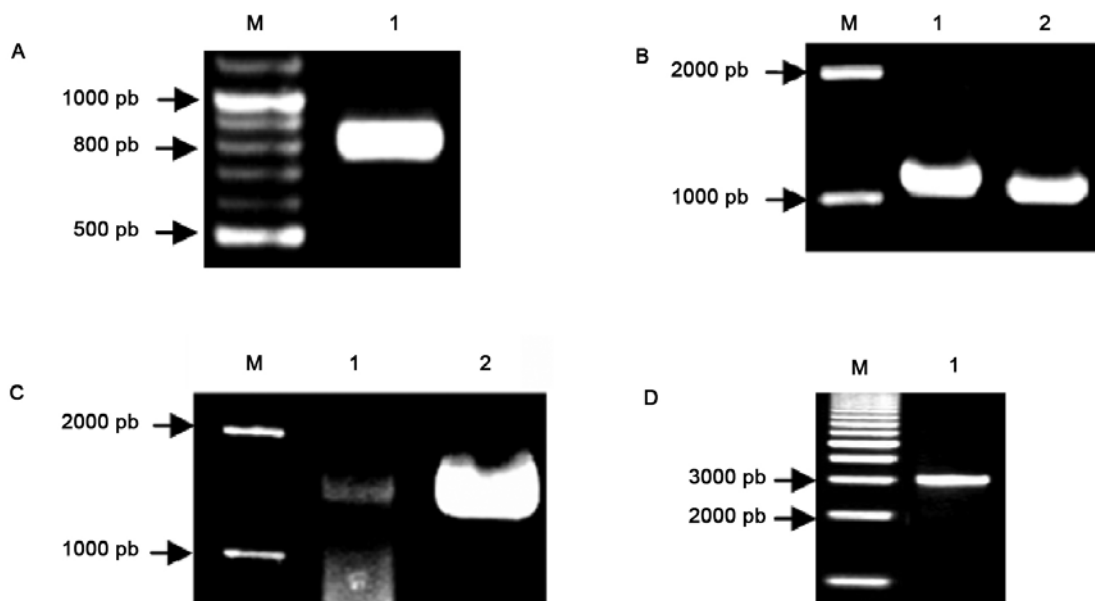
Gambar 2. Hasil amplifikasi cDNA menggunakan primer *ActF* dan *actR*

Isolasi cDNA Spesifik

PCR dengan menggunakan pasangan primer AF2 – AR2 dan PMA2-F – MaPMAp-R dengan cDNA total sebagai cetakan masing-masing menghasilkan fragmen cDNA *Mmpmam* (Gambar 3A) dan *Mmpma5'* (Gambar 3B) sedangkan fragmen cDNA *Mmpma3'* disintesis menggunakan metode 3' RACE (Gambar 3C). cDNA gen *Mmpma* diperoleh dengan PCR menggunakan cetakan gabungan ketiga fragmen tersebut dengan primer PMA2-F dan 3'UTR-R menghasilkan pita seperti pada Gambar 3D. Berdasarkan urutan nukleotida fragmen *Mmpma5'* dan *Mmpma3'* (data tidak ditampilkan) menunjukkan bahwa ukuran kedua fragmen tersebut adalah masing-masing 1,055 pb dan 1,443 pb (data tidak ditampilkan). Gabungan ketiga fragmen *MmPMA* ini berukuran 3,155 pb (Gambar 4) dan telah didaftarkan dalam GenBank dengan No. Akses JQ360855. Gabungan fragmen ini mengandung kodon awal (ATG), kodon akhir (TGA), 3'UTR, dan *putative polyadenylation signal* (AATAAAT). cDNA *MmPMA* dan 3'UTR, yang berukuran 3,126 pb, telah berhasil diklon ke dalam vektor pGEM-T Easy dan diverifikasi urutan nukleotidanya (data tidak ditampilkan). Hasil pengklonan ini selanjutnya disebut sebagai p*MmPMA* (Gambar 5). Plasmid ini sangat penting dalam konstruksi vektor ekspresi untuk menghasilkan tanaman transgenik toleran Al dan pH rendah.

Analisis Urutan Nukleotida *MmPMA*

Analisis urutan nukleotida menunjukkan bahwa cDNA *MmPMA* berukuran 2,871 pb yang menyandi 956 asam amino. Setelah kodon akhir (2,872 pb), terdapat 3'UTR (*untranslated region*) berukuran 284 pb termasuk di dalamnya adalah poliadenin. *MmPMA* memiliki *putative polyadenylation signal* AATAAAT, 64 pb setelah kodon akhir. *Polyadenylation* dikenal sebagai mekanisme regulasi utama setelah transkripsi pada eukariot. Analisis kesejajaran berdasarkan urutan nukleotida dengan bank data di GenBank dengan program BLAST menunjukkan bahwa *MmPMA* mempunyai kesamaan 82% dengan pma *Vitis vinifera* (XM_002270308); 81% masing-masing dengan pma *Juglans regia* (AY347715), pma *Populus trichocarpa* (XM_002322091), pma *Sesbania rostrata* (AB086374), dan pma *Prunus persica* (AJ271439); serta 80% dengan pma *Lycopersicon esculentum* (AF275745) (data tidak ditampilkan). Analisis situs restriksi terhadap urutan nukleotida *MmPMA* dengan Program BioEdit versi 7.0.9.0 menunjukkan bahwa kecuali *NcoI*, *PstI*, *NdeI*, *SacI*, *BstXI* dan *NsiI*, nukleotida tersebut tidak mengandung situs restriksi yang terdapat pada situs multi pengklonan dari pGEM-T Easy. Fragmen *MmPMA* disisipkan di antara situs *ApaI*, *AatII*, *SphI*, *NcoI*, *BstZI*, *NotI*, *SacII*, *EcoRI* di satu sisi dan *SpeI*, *EcoRI*, *NotI*, *BstZI*, *PstI*, *SalI*, *NdeI*, *SacI*, *BstXI*, *NsiI* di sisi lain sehingga kecuali *NcoI*, *PstI*, *NdeI*, *SacI*, *BstXI* dan *NsiI*, situs-situs tersebut dapat digunakan untuk mengeluarkan sisipan *MmPMA* dari



Gambar 3. Hasil isolasi bagian-bagian gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma dari *M. malabathricum*. A, fragmen *Mmpmam* (806 pb); B, fragmen *Mmpma5'* (1055 pb); C, fragmen *Mmpma3'* (1443 pb) dan D, *MmPMA* (3126 pb)

5' **atg**gggggagaagcctgagctgctggaggcagtgctgaaggaaagcagtggtattggagaacattcctatttgaggaaagtgttggagaatctgagatgcaggaaggagggcctgaccaccagctcgccgaggagcgcttgcatatttcgggcagaagtagctcgaggagaagaaggagagcaagttcttgaagttcttgggggttatgttggaatcctctgtcttgggtcatggaagctgcagcaatcatggccattggccctggcaattggaggagggaagccctctgatttggcaggattttgtcggtatcataactcttctcttcattaaactcgacgatcagcttcatcgaggaaaataatgcgggtaatgctgccgctgctttagtggtctgctgcgccccaaaggcttctacgagatggaaggtggagtgaggaaagcagctgtgctagtccttggggatataatcagcattaaacttggagacataattcctgctgatgctcgcttcttggaggagatcccttgaaaattgaccagctctgcactcactggtgaatctctgcccgtcaccaaaggccctggagatggtgtttattcaggttccacatgtaagcaaggggaaattggaagctgtggttattggccattggtgcaactttcttggcgaaggcgccacacttggtggataccataactcaagtgggacattccagaaggttttactgctgaatttggaaatttctgcattttgctcgattgctgctcgggatgataattgaaattattgtcatgtatccgattcaacggaggaaatatcgccctggaatcgacaatcttcttgttcttctcatcgagggaatccctattgccatgctaccgcttcttcagtcaccatggccattggtctctcacaggctatctcagcagggagcgatcaccaagagaaatgcagcaaatcgaagagatggctggaattggatgctctctcgagtgataagactgggacttgactttgaacaagcttactgttgacaaaaactctcatcgaggtcttcttgcgaaggagtggaaccgggatactgttgcctgatggctgctagagcattcgaggacga aaaccaagatgccatagattccgccatagttgggatgctagctgatccaaaagaggctcgactctgggattcaggaagtac actttcttccctttaaccctactgacaagaggaccgcttggacctacatcgattccgagggcaggatgcacagagtgagc aaagggtgctccagagcagatcctgaacctcgccacaataagtcggagattgagcgtcgagtcctatgcccgtgattgataa atttggccgagcgtggtgctgcgatgaacttgcagtagctatcaggaagttccagaaggagaagaaggagtcctggaggcc cgtggcgatctcatcggtctgatgacctgtgtttgatccccccaggcatgacagtgccgagacaattaggagggtcttaatt ctgggggttaatgtcaaaatgatcacgggggatcaatttgctataggcaaaagaactggccgtcggttgggaatgggcatt aaacatgtacccttcttctgctttattaggtcagaataaggatgaatcgattgctgcgctgccagttgatgagctcattg aaaaggcagatggctttgtggtgttttccccgagcataagtatagattgtggaagcgattacaagcaaggaaacataata tbtggcatgacaggagatggtgtcaacgatgcccctgccctaaagaaggctgatattgggatagctgttgccgatgccac tgatgctgctcgtagtgcttctgacattgtgctcactgagcctggccttagtgtcatcatcagtgctgtcctcaccagtc gtgctatcttccaaaggatgaaaaattacacattctacgcagtttctattacaattcgtatagtgcttggattcatgtta ttggccctcatatggaagttgactttcccccttttacttggtgctgactggttgcctatcctcaatgatggttagctcatgac aatctcgaaggatagggtgaaacatcacctcttcccgacagctggaagctcgagaattctcactactgggaattgttgc tcggcagttacctggctatgatgacggttatcttcttgggcagcctacgaaactaacttcttcccgagagtttttggc gttagcactcttgagaagactgcccatgacgactccgaaagcttgccctccgcatataacttgcaagtgagtcatactacg tcaggccttgatatttgtgacacgatccagggttggtctactcagtcgagcgtccgggttgttgcctcattgcccgttttg ttagtgcctcaactgattgctactcttaattgcggtttacgcgagctggggctttgcgctatcgagggttggatgggtt tgggcccgtgtcatctggctttataacatcatcttttacatcccgcttgacttcatcaagttcttcatccggttatgcatt gagtgggaaggcctgggattctgttatcgagcagaggattgcattcacgaggcaaaaggactttggaaaagaacagcgcg agcttcaatgggacacgcacaaagaacactgcattgggtgcaaccacccgacacaaaaatattcactgagcgtactcgc ttccgcgaaactcaatcatattgtctgaagaagctaaagaagagcgagatagcaggttgagggaactgaattacctgaa aggtcatgtggaatcagttgtgagactgaagggaacttgacatagacgaacatccagcaagcatacacagctc**tgaggagagc** aacacgatcttctgtagctccggctcttatcatggcattcttatctgtgctgaggcc**caataaaatcgtgtaacttagcagtg** tgtcaacagtttctgtcgtggtagcttgggcaatccccatttcgcaccccttgaaaaatgcctcaagaggggacaccacggc gaacgactctgtgaagctttgtcgaagaggttgaacaaacagtagcggcctacttttgtattaatcttatgcaactgtcga ttttgattatgctca**aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa** 3'

Gambar 4. Hasil pengurutan nukleotida gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma dari *M. malabathricum* (*MmPMA*) berukuran 3,156 pb dengan No. Akses GeneBank JQ360855 dan diperoleh dari penggabungan fragmen *Mmpma5'*, *Mmpmam*, dan *Mmpma3'*. Kotak = kodon awal; garis bawah tebal = kodon akhir; garis bawah pada huruf miring = *putative polyadenylation signal*; huruf miring = 3'UTR (*untranslated region*); dan huruf miring tebal = ekor poli(A)

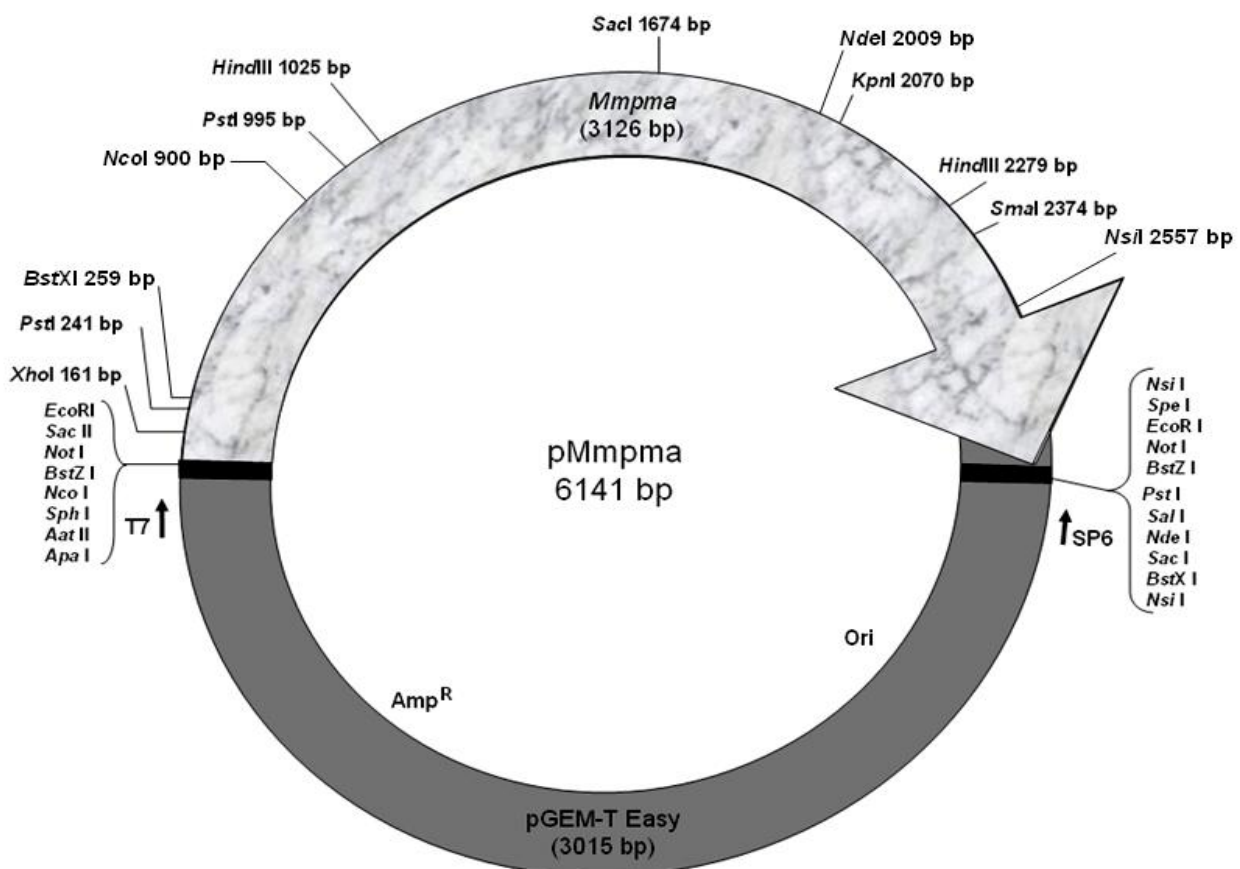
plasmid rekombinan (Gambar 5). Peta situs restriksi sangat penting dalam rekayasa genetika.

Analisis kesejajaran berdasarkan urutan asam amino menunjukkan bahwa MmPMA mempunyai kesamaan 94% masing-masing dengan PMA *Vitis vinifera* (XP_002270344) dan PMA *Juglans regia* (AAQ55291), 93% dengan PMA *Populus trichocarpa* (XP_002322127), 92% dengan PMA *Vicia faba* (CAC29435), *Lycopersicon esculentum* (AF179442), *Solanum tuberosum* (CAA54046), dan *Arabidopsis thaliana*, AHA4 (NP_190378) (data tidak ditunjukkan).

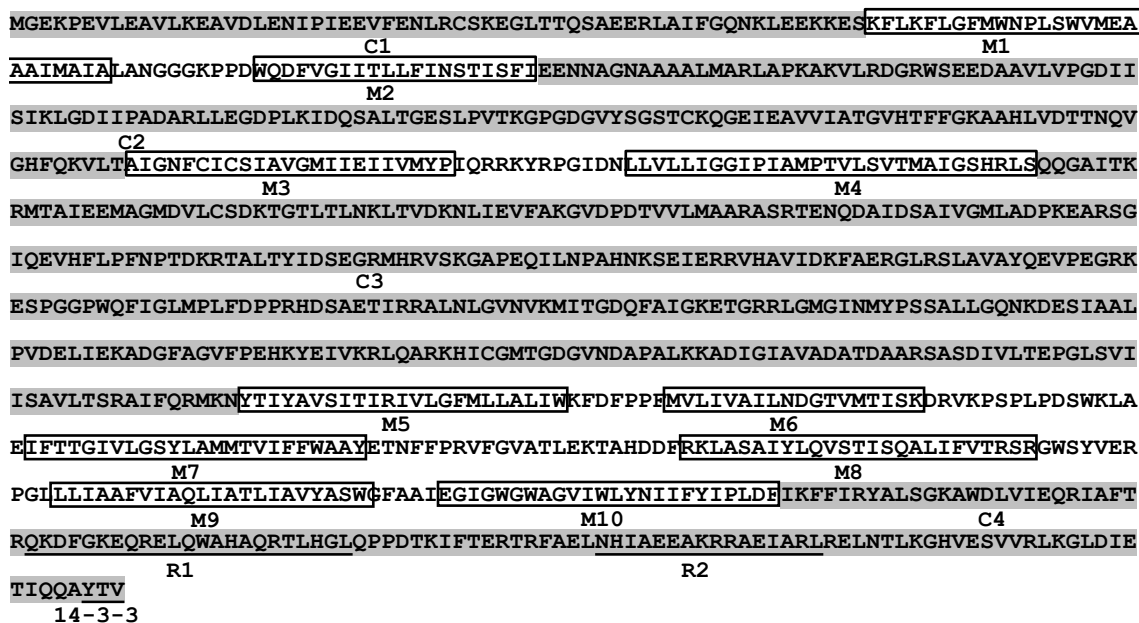
Struktur dua dimensi protein H⁺-ATPase membran plasma (PMA) yang memiliki 10 domain transmembran (M1-M10), 4 loops sitoplasma (C1-C4), dan 6 domain fungsional (F1-F6) digambarkan oleh Burghoorn *et al.* (2002) dan Fuglsang *et al.* (2011). Pada C2 mempunyai sekuen terkonservasi TGES (domain aktivitas fosfatase, F1), pada C3 mempunyai DKTGT(LI)T (domain fosforilasi intermediet dan transduksi, F2), KGAP (domain pengikatan ATP dan/atau aktivitas kinase, F3), DPPR (domain pengikatan ATP, F4), M(LIV)TGD (domain pengikatan ATP, F5) dan GDG(VIT)ND(AS)P(AS)LK (domain pengikatan ATP, F6) (Burghoorn *et al.*, 2002), sedangkan pada C4 mempunyai Region 1 (R1), R2, dan 14-3-3 (domain

autoregulator) (Dubey *et al.*, 2009; Fuglsang *et al.*, 2011), domain transmembran, loops sitoplasma, domain fungsional dan domain autoregulator pada *M. malabathricum* L. ditunjukkan Gambar 6. Berikutnya, pada loop sitoplasma kedua (C2) terdapat sekuen terkonservasi TGES (domain aktivitas fosfatase, F1), sedangkan pada C3 terdapat sekuen DKTGTLT (domain fosforilasi dan transduksi, F2), KGAP (domain pengikatan ATP dan/atau aktivitas kinase, F3), DPPR (domain pengikatan ATP, F4), MITGD (domain pengikatan ATP, F5) dan GDGVNDAPALK (domain pengikatan ATP, F6). Sedangkan domain autoregulator mempunyai sekuen QKDFGKEQRELQWAHAQRTLHGL (R1), NHIAEEAKRRAEIARL (R2), dan YTV (14-3-3). MmPMA memiliki berat molekul 105.29 kDa dengan perkiraan titik isoelektrik 6.84.

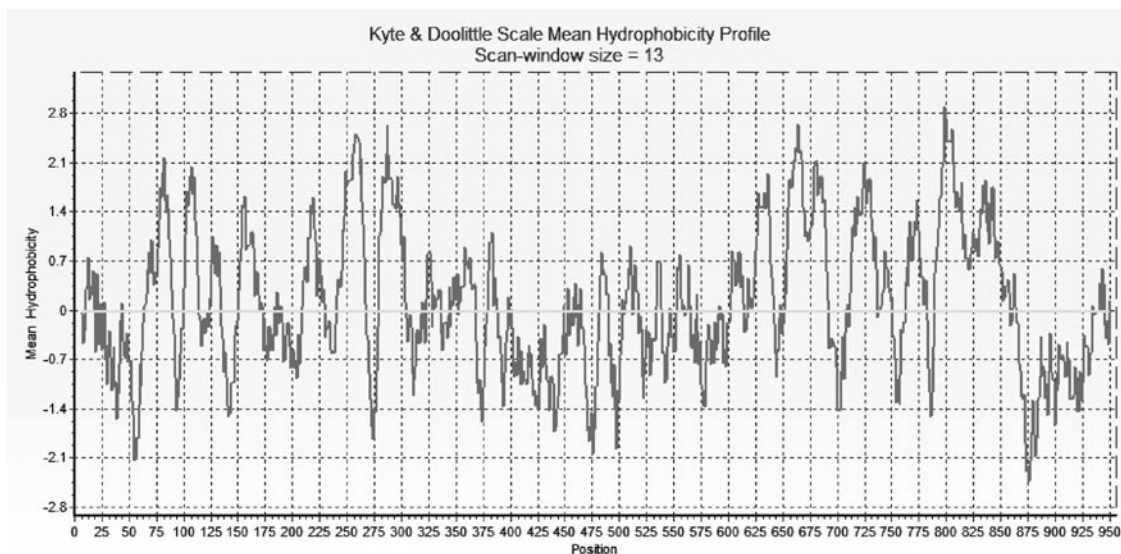
Berdasarkan analisis hidrofobisitas (Gambar 7), MmPMA menunjukkan profil yang sama dengan PMA lain (data tidak ditampilkan). Kurva yang berada di atas 0 menunjukkan fragmen yang bersifat hidrofobik dan di bawah 0 bersifat hidrofilik. Berdasarkan Gambar 7, MmPMA mempunyai 10 domain transmembran yang ditunjukkan oleh adanya 10 puncak dominan di atas 0 (M1-M10) dan 4 loops sitoplasma yang ditunjukkan oleh 4 puncak dominan di bawah 0 (C1-C4).



Gambar 5. Peta plasmid pMmpMA (6,141 pb) yang terdiri atas vektor pGEM-T Easy (3,015 pb) dan cDNA *MmPMA* (3,126 pb)



Gambar 6. Deduksi asam amino gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma dari *M. malabathricum*. Kotak, transmembran 1-10 (M1-M10); latar belakang gelap, 4 loops sitoplasma (C1-C4); huruf tebal, 6 domain fungsional (TGES, DKTGTLT, KGAP, MITGD, dan GDGVNDAPALK); dan huruf tebal dan garis bawah, domain autoregulator (R1, R2, dan 14-3-3). 14-3-3, situs pengikatan protein 14-3-3 yang mengatur aktivitas enzim



Gambar 7. Profil hidrofobisitas MmPMA menggunakan skala Kyte & Doolittle. Angka 1-10 menunjukkan domain transmembran dan C1-C4 menunjukkan domain sitoplasma

KESIMPULAN

Gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma utuh (*full length*) yang telah berhasil diisolasi dan diklon berukuran 2,871 pb yang menyandi 956 asam amino. Berdasarkan urutan nukleotida, *MmPMA* mempunyai kesamaan 82% dengan PMA *Vitis vinifera* (XM_002270308); 81% masing-masing dengan PMA *Juglans regia* (AY347715), PMA *Populus trichocarpa* (XM_002322091), PMA *Sesbania rostrata* (AB086374), dan PMA *Prunus persica* (AJ271439); serta

80% dengan PMA *Lycopersicon esculentum* (AF275745). Berdasarkan deduksi asam amino, *MmPMA* mempunyai kesamaan 94% masing-masing dengan PMA *Vitis vinifera* (XP_002270344) dan PMA *Juglans regia* (AAQ55291), 93% dengan PMA *Populus trichocarpa* (XP_002322127), 92% dengan PMA *Vicia faba* (CAC29435), *Lycopersicon esculentum* (AF179442), *Solanum tuberosum* (CAA54046), dan *Arabidopsis thaliana*, AHA4 (NP_190378). Selain daerah penyandi, 3'UTR dari *MmPMA* juga telah berhasil diklon.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami berterima kasih kepada Program BPPS, Kementerian Pendidikan Nasional, Indonesia atas beasiswa yang telah diberikan; Hibah Kompetensi a.n. Dr. Suharsono dengan judul isolasi dan ekspresi gen dalam rangka perakitan tanaman yang toleran terhadap cekaman asam dan aluminium atas dukungan sebagian besar dana penelitian; Prof. Ko Shimamoto dan Dr. Wong Hann Ling dari Plant Molecular Genetics Laboratory, Nara Institute of Science and Technology, Japan atas dukungan fasilitas laboratorium, bahan kimia, dan bantuan teknik laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahn, S.J., Z. Rengel, H. Matsumoto. 2004. Aluminum-induced plasma membrane surface potential and H⁺-ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. *New Phytol.* 162:71-79.
- Anwar, S., M. Jusuf, Suharsono, D. Sopandie. 2000. Pengklonan gen yang diinduksi oleh aluminium pada kedelai. *J. Bioteknol. Indonesia* 5:7-16.
- Burghoorn, H.P., P. Soteropoulos, P. Paderu. 2002. Molecular evaluation of the plasma membrane proton pump from *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chem* 46:615-624.
- Duby, G., W. Poreba, D. Piotrowiak, K. Bobik, R. Derua, E. Waelkens, M. Boutry. 2009. Activation of plant plasma membrane H⁺-ATPase by 14-3-3 proteins is negatively controlled by two phosphorylation sites within the H⁺-ATPase C-terminal region. *J. Biol. Chem.* 284:4213-4221.
- Fuglsang, A.T., J. Paez-Valencia, R.A. Gaxiola. 2011. Plant proton pumps: regulatory circuits involving H⁺-ATPase and H⁺-PPase. p. 39-64. *In* M. Geisler, K. Venema (Eds.). *Transporters and Pumps in Plant Signaling*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Janicka-Russak, M. 2011. Plant plasma membrane H⁺-ATPase in adaptation of plants to abiotic stresses. p. 197-218. *In* A. Shanker, B. Venkateswarlu (Eds.). *Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*. In Tech, Croatia.
- Janicka-Russak, M., G. Kłobus. 2007. Modification of plasma membrane and vacuolar H⁺-ATPase in response to NaCl and ABA. *J. Plant Physiol.* 164:295-302.
- Ligaba, A., M. Yamaguchi, H. Shen, T. Sasaki, Y. Yamamoto, H. Matsumoto. 2004. Phosphorus deficiency enhances plasma membrane H⁺-ATPase activity and citrate exudation in greater purple lupin (*Lupinus pilosus*). *Funct. Plant Biol.* 31:1075-1083.
- Muhaemin. 2008. Analisis pertumbuhan *Melastoma* (*Melastoma malabathricum* auct. Non L. dan *M. affine* D. Don.) yang mendapat cekaman pH rendah dan aluminium. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Mutiasari, A. 2008. Akumulasi aluminium pada *Melastoma affine* dan *Melastoma malabathricum*. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Muzuni, D. Sopandie, U.W. Suharsono, Suharsono. 2010. Isolasi dan pengklonan fragmen cDNA gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma dari *Melastoma malabathricum* L. *J. Agron. Indonesia* 38:67-74.
- Rober-Kleber, N., T.P. Albrechtova, S. Fleig, C. Fischer-Iglesias. 2003. Plasma membrane H⁺-ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development. *Plant Physiol.* 131:1302-1312.
- Shen, P., R. Wang, W. Zhang. 2011. Rice phospholipase Da is involved in salt tolerance by the mediation of H⁺-ATPase activity and transcription. *J. Integrative Plant Biol.* 53:289-299.
- Suharsono, S. Firdaus, U.W. Suharsono. 2008. Isolasi dan pengklonan fragmen cDNA dari gen penyandi multidrug resistance associated protein dari *Melastoma affine*. *Makara Sains* 12:102-107.
- Suharsono, N., L.D. Trisnaningrum, U. Sulistyaningsih, Widyastuti. 2009. Isolation and cloning of cDNA of gene encoding for metallothionein type 2 from *Melastoma affine*. *Biotropia* 16:28-37.
- Wang, J., H. Raman, G. Zhang, N. Mendham, M. Zhou. 2006. Aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.): physiological mechanisms, genetics and screening methods. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 7:769-787.
- Watanabe, T., M. Osaki. 2002. Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plants species growing in acid soils: a review. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 33:1247-1260.
- Watanabe, T., S. Jansen, M. Osaki. 2003. A physiological study of *Melastoma malabathricum*, an aluminum accumulating woody plant. <http://www.keele.ac.uk/depts/ch/groups/aluminium/watanabe.Po.pdf>. [15 Februari 2004].

- Watanabe, T., S. Jansen, M. Osaki. 2005. The beneficial effect of aluminium and the role of citrate in Al accumulation in *Melastoma malabathricum*. *New Phytol.* 165:773-780.
- Young, J.C., N.D. DeWitt, M.R. Sussman. 1998. A transgene encoding a plasma membrane H⁺-ATPase that confers acid resistance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Genetics* 149:501-507.
- Zhu, Y.T., J. Lian, H.Q. Zeng, L. Gan, T.J. Di, Q.R. Shen, G.H. Xu. 2011. Involvement of plasma membrane H⁺-ATPase in adaption of rice to ammonium nutrient. *Rice Sci.* 18:335-342.